

**МИНСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

 28.04.2019 г.



Регистрационный № 087-0619

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ  
НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У  
ДЕТЕЙ**

**Инструкция по применению**

**Учреждения-разработчики:** Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии»

**Авторы:** Т.М. Михалевская, Е.В. Волочник, д.м.н. Конопля Н.Е., д.м.н.,  
член-корреспондент НАН Беларуси О.В. Алейникова

**Минск, 2019**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневич  
28.06.2019  
Регистрационный № 087-0619

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ  
НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: Т. М. Михалевская, Е. В. Волочник, д-р мед. наук Н. Е. Конопля, д-р  
мед. наук, чл.-кор. НАН Беларуси О. В. Алейникова

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения вероятности прогрессирования медуллобластомы, пилоцитарной астроцитомы и диффузной астроцитомы, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по лечению опухолей головного мозга у детей.

Метод предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающим медицинскую помощь пациентам, страдающим опухолями головного мозга.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Микротом.
2. Сухожаровой шкаф.
3. Автоматический иммуногистохимический стейнер.
4. Прямой светооптический микроскоп.
5. Вытяжной шкаф.
6. Водяные бани-термостаты (2 шт.).
7. Микроцентрифуга-вортекс.
8. Гибридизатор (с возможностью охлаждения рабочей поверхности от 85 до 37 °С в течение 1 мин).
9. Автоматические дозаторы переменного объема.
10. Холодильник (2–8 °С).
11. Морозильник (-20 °С).
12. Микроскоп флуоресцентный (общее увеличение x1 000; объектив x100 подпружиненный, для масляной иммерсии).

#### **Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:**

1. Стекла с адгезивным электростатическим покрытием.
2. Реагенты для депарафинизации.
3. Буфер для демаскировки с высоким pH.
4. Универсальная визуализирующая система.
5. Контр-краситель.
6. Ксилол.
7. Монтирующая среда.
8. Первичные антитела к pERK1/2, BRAF V600E, H3K27trimethylated, ATRX, p53, IDH1R132H, beta-catenin, GAB1, NGFR.
9. Метанол.
10. Ледяная уксусная кислота.
11. ДНК-зонды для флуоресцентной *in situ* гибридизации, специфичные к хромосомным регионам 2p24/ген *MYCN*, 8q24/ген *MYCC*, cen6 и 6q23, 17p13/17q21-22, 9p21-22/ген *CDKN2A* (p16).
12. Буфер для флуоресцентной *in situ* гибридизации.
13. Раствор 20xSSC.
14. Детергент NP40.
15. Рабочий раствор красителя DAPI (125 ng/mL).

16. Спирт этиловый 70, 80, 96°.
17. 0,25 % раствор трипсина.
18. Пепсин.
19. Раствор 1хDPBS.
20. Микропробирки объемом 1,5 и 0,5 мл.
21. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.
22. Предметные стекла.
23. Покровные стекла разных размеров: 18x18, 22x22, 24x24.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Наличие у пациентов моложе 18 лет медуллобластомы, пилоцитарной астроцитомы, диффузной астроцитомы II–IV степени злокачественности.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

#### **1. Гистологическое светооптическое исследование**

Выполняют гистологическое исследование по стандартной технологии. Осуществляют светооптическое исследование микропрепарата биопсийного материала опухоли с определением нозологии (медуллобластома, пилоцитарная астроцитома, диффузные астроцитомы II–IV степени злокачественности, смешанные нейроглиальные опухоли). Также оценивают информативность материала и выбирают наиболее репрезентативные участки ткани для проведения иммуногистохимического и цитогенетического исследования. В зависимости от нозологии выбирают диагностическую панель:

для медуллобластомы определяют экспрессию иммунофенотипом beta-catenin, GAB1, NGFR, p53 и цитогенетически статус генов N-MYC, C-MYC, monob(del6q) и i17;

для пилоцитарной астроцитомы — экспрессию pERK1/2, BRAF V600E и статус гена CDKN2A;

для диффузной астроцитомы II–IV степени злокачественности — pERK1/2, BRAF V600E, H3K27me, ATRX, p53, IDH1R132H и статус гена CDKN2A.

#### **2. Иммуногистохимическое исследование**

Для иммуногистохимического исследования на микротоме нарезают срезы толщиной 3 мкм из выбранных готовых парафиновых блоков. Срезы ткани опухоли помещают на стекла с адгезивным электростатическим покрытием и высушивают в сухожаровом шкафу при температуре 100 °С в течение 60 мин. Депарафинизацию производят в автоматическом иммуногистохимическом стейнере с использованием коммерческого депарафинизирующего раствора с последующей тепловой демаскировкой эпитопа в коммерческом буфере с высоким pH при температуре 37 °С в течение 30 мин.

После экспозиции соответствующими первичными антителами в течение 32 мин при температуре 37 °С на препараты наносят коммерческую визуализирующую систему, содержащую универсальную визуализирующую систему на основе полимера; DAB-хромоген; DAB-субстрат; wash буфер; пероксидазный блок. Затем предметные стекла докрашивают контр-красителем в течение 8 мин, промывают в теплой мыльной воде, обезвоживают с помощью спиртов с восходящей концентрацией, в ксилоле, покрывают с использованием монтирующего реагента.

Результаты оценивают с использованием светового микроскопа. Позитивным считают окрашивание на p53 при ядерном окрашивании более 10 % опухолевых клеток при подсчете не менее 1000 клеток, на beta-catenin — при наличии цитоплазматического и ядерного окрашивания, на ATRX, H3K27me — при наличии ядерного окрашивания более 10 % опухолевых клеток, на GAB1 — при наличии диффузного цитоплазматического окрашивания, на NGFR — при наличии мембранного окрашивания, на BRAF V600E и IDH1 R132H — при наличии цитоплазматического окрашивания; гиперэкспрессия pERK1/2 учитывалась при наличии ядерного и цитоплазматического окрашивания более чем в 25 % опухолевых клеток. Экспрессию BRAF V600E изучают в комплексе с оценкой pERK1/2 для исключения ложнопозитивной экспрессии BRAF V600E.

### 3. Цитогенетическое исследование

Препараты переносятся в предварительно прогретый раствор 2xSSC (37 °С, 30 мин для мазков-отпечатков; 80 °С, 10 мин для FFPE). Охлаждаются в дистиллированной воде 3 мин и подсушиваются 2 мин при комнатной температуре. Далее переносятся в заранее прогретый до 37 °С рабочий раствор трипсина (на 45–55 мин для FFPE) или пепсина (на 3 мин при мазках-отпечатках). После ферментной обработки срез промывается в дистиллированной воде, подсушивается при комнатной температуре и дегидратируется при помощи серии спиртов (70, 80, 96°) по 2 мин в каждом растворе. Время и температура денатурации и гибридизации осуществляется согласно рекомендациям фирмы-производителя при помощи гибридизатора.

После окончания гибридизации с препаратов снимаются покровные стекла, их отмывают в растворах 0,4xSSC с добавлением 0,3 % NP40 и 2xSSC с добавлением 0,1 % NP40 (температура и время согласно рекомендациям фирмы-производителя зонда). Затем выполняется дегидратация стекол в серии спиртов и их дальнейшая сушка при комнатной температуре в темноте (20–30 мин). После высыхания в зону интереса наносится рабочий раствор DAPI.

Анализ начинается через 10–15 мин после нанесения раствора DAPI. Исследование производится под соответствующими флуорохромом фильтрами. При невозможности анализа в день окраски стекла можно поместить в холодильник (2–8 °С) на несколько дней или в морозильник (-20 °С) на 1–2 недели без потери качества изображения. Анализ и регистрация данных производят в соответствии с рекомендациями ISCN2013. При подсчете диффузно располагающихся клеток с aberrантным расположением сигнала среди клеток с нормальным статусом учитывается процент анализируемого клона: для мазков-

отпечатков положительным результатом считается более 15 % клеток, для FFPE — более 30–35 %.

### **Определение вероятности прогрессирования нейроэпителиальных опухолей головного мозга у детей**

Метод определения вероятности прогрессирования нейро-эпителиальных опухолей головного мозга у детей представлен в виде таблицы.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ ИСПРАВЛЕНИЯ**

1. Использование реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: соблюдать условия хранения.

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно проверять автоматические дозаторы переменного объема.

3. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.